

2PE-07

エストラジオールのオンライン LC-GC 誘導体化分析法の開発

○馬場健史¹, 山下俊幸¹, 奥野将司¹, 内田滋², 佐々野僚一², 福崎英一郎¹
 (¹大阪大学, ²(株) アイスティサイエンス)

【はじめに】

環境試料中におけるエストラジオールの分析は、夾雑物の除去、誘導体化が必要になるなど前処理に手間がかかり、分析作業が煩雑になっている。演者らは、夾雑物の除去と誘導体化を自動で行うオンライン LC-GC 誘導体化法の開発を行い、エストラジオールの自動誘導体化分析が可能になったので、その知見と共に報告する。

【方法】

装置 HPLC: Agilent 1100、LC-GC インターフェース: LGI-S110、大量注入口装置: LVI-S200、GC/MS: Agilent 6890N / 5975C

オンライン LC-GC 誘導体化法 逆相系 HPLC で目的物質が溶出される付近（予め標準溶液で目的物質のリテンションタイムを調べておく）を分取しながらその分取液に水を加えて希釈し、そのまま固相カートリッジ(C18-10 mg)へ通水させ、目的物質を吸着（保持）させた(図 1)。その後、固相を窒素ガスで乾燥させた後、溶出させながら、スパイラルインサートを備えた GC へ溶出液を直接注入し(図 2)、大量注入法を用いて測定を行った。固相からの溶出は 5%MSTFA 含有アセトン-ヘキサン(1/3)混合溶液 60 μ L で行った。インサート中での濃縮および誘導体化時間は 36 秒、その温度は 70°C で行った。

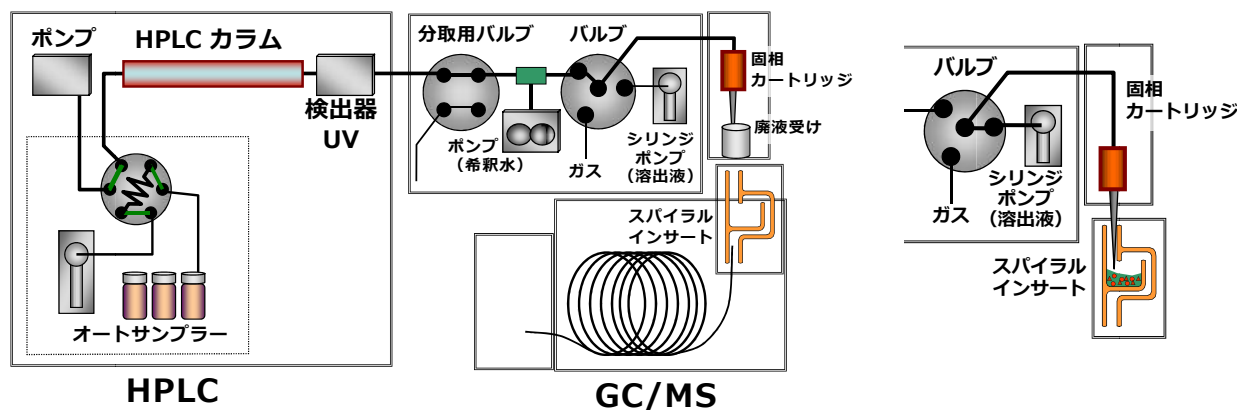


図 1. HPLC-(SPE)-GC/MS システム

図 2. 溶出と誘導体化注入工程

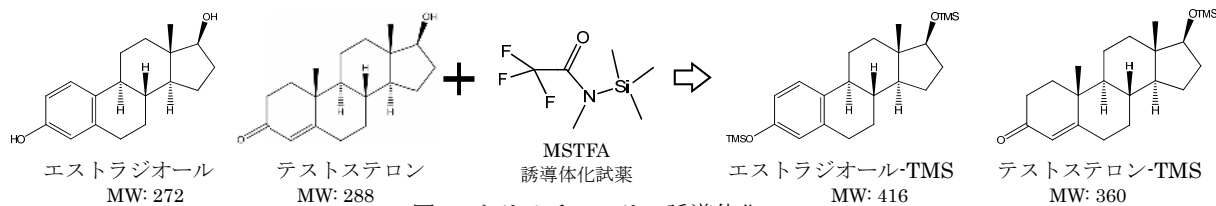


図 3. トリメチルシリル誘導体化

Development of the on-line LC-GC automatic derivatization method of estradiol

○Takeshi BAMBA¹, Toshiyuki YAMASHITA¹, Masashi Okuno¹, Shigeru UCHIDA², Ryoichi SASANO², Eiichiro FUKUSAKI¹

¹Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan ²AiSTI SCIENCE co., 120-6 Kuroda, Wakayama 640-8341, Japan

【結果と考察】

1. 誘導体化について

手作業で誘導体化した 17β -エストラジオール-TMS を GC/MS で測定したものをスタンダードとして、オンライン LC-GC/MS で誘導体化分析法により得られた回収率は 80% (n=5) であった。また、非誘導体化の 17β -エストラジオールは検出されなかった。再現性は相対標準偏差 (RSD; n=5) が 2%以内と良好な結果が得られた。従来の誘導体化は 30 分以上の時間を要するが本法は 36 秒と大幅に時間を短縮できた。誘導体化が効率良く行われた理由として、誘導体化試薬 MSTFA を添加したアセトン-ヘキサン混合溶液で溶出させながら直接 GC へ注入した後、インサート中での濃縮工程において溶媒分子が少なくなることで、エストラジオール分子と誘導体化試薬分子の衝突率が高まり、さらに注入口の熱が加わることで反応が促進されたことによると考えられた。さらに実用性を考慮し、エストラジオールの近くに溶出するテストステロンを添加した混合標準液を本法により測定した結果、両化合物の分離および検出が可能であった。

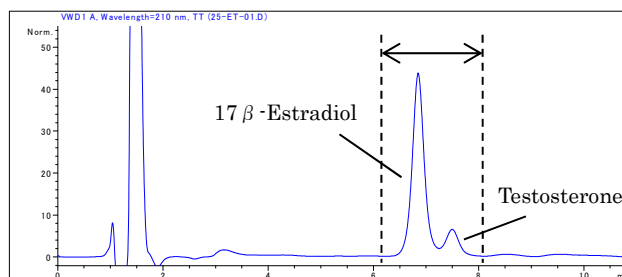


図 4. HPLC-UV クロマトグラムと分取部分

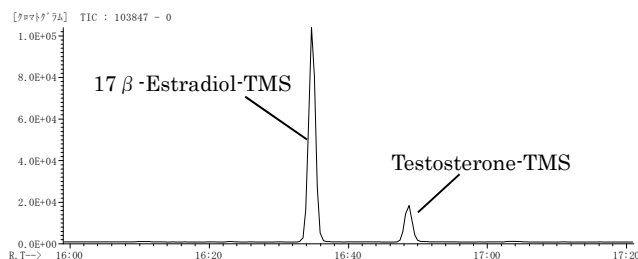


図 5. HPLC-GC/MS トータルイオンクロマトグラム

2. 感度について

本法では HPLC に注入した目的物質を固相に保持させて、その全量を GC/MS へ導入しているため、HPLC の注入量を増加させることで容易に感度を向上することができた。

3. 環境水への応用について

本法を用いて水試料中のエストラジオール分析への応用を試みた。

前処理の簡易化：

本法により装置の感度を大幅に向上できたことから、試料水の量を従来の 1 L から 100 mL に減らすことができた。そして、前処理の固相の充填量も少量化することができた。また、誘導体化は水分があると不安定になることが多く、通常、濃縮乾固するか、固相を十分に吸引乾燥させて水分を完全に除去する必要がある。本法では最終検液を HPLC に注入するため、最終検液に水分が含まれた状態でも分析可能であることから、乾燥作業工程を省くことができた。これらにより、本法では前処理時間を大幅に短縮することができた。

精製水における添加回収試験：

精製水を用いて試料中濃度 1 ng/L での添加回収試験を行った (n=5)。検量線は HPLC-GC/MS で作成した。その結果、 17β -エストラジオールの回収率は 101%、再現性は RSD が 5.1% と良好な回収率と再現性を得ることができた。

【まとめ】

オンライン LC-GC 誘導体化分析法により、再現性の良いエストラジオールの自動誘導体化分析が可能となった。また、本法は前処理の簡易化および迅速化、さらには高感度分析が実現できた。

今後、夾雑物の多い試料中の誘導体化を行う分析への応用が期待できる。

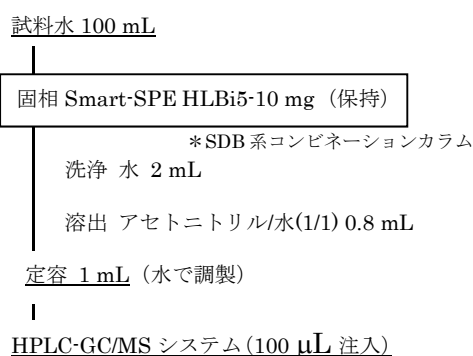


図 6. 水中エストラジオール分析法

エストラジオールのオンラインLC-GC誘導体化分析法の開発

○馬場健史¹, 山下俊幸¹, 奥野将司¹, 内田滋², 佐々野僚一², 福崎英一郎¹

(¹大阪大学大学院工学研究科, ²(株) アイスティサイエンス)

1 目的

環境試料中におけるエストラジオールの分析は、夾雑物の除去、誘導体化が必要になるなど前処理に手間がかかり、分析作業が煩雑になっている。

演者らは、夾雑物の除去と誘導体化を自動で行うオンラインLC-GC誘導体化法の開発を行い、17β-エストラジオールの自動誘導体化分析が可能になったので、その知見と共に報告する(図1)。

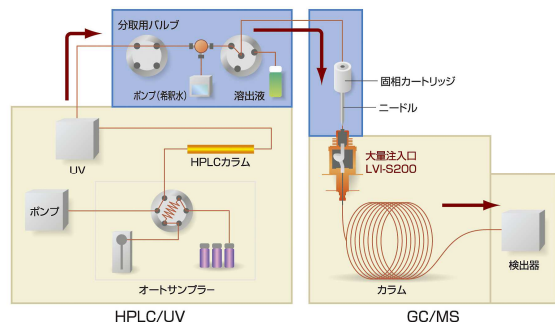


図1 オンラインHPLC-GC/MSシステム

2 方法

2.1 オンラインLC-GC誘導体化注入

逆相HPLCで目的物質を固相カートリッジに分取した後、5%MSTFA含有アセトン/ヘキサン(1/3)混合溶液60μLでGCインサートへ溶出しながら注入した(図2)。

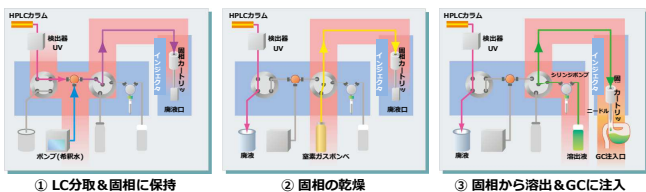


図2 オンラインLC-GC注入の流れ

GCインサート中での濃縮および誘導体化導入は70℃、36秒でおこな(図3)、表1のLC-GC/MS条件で測定した。

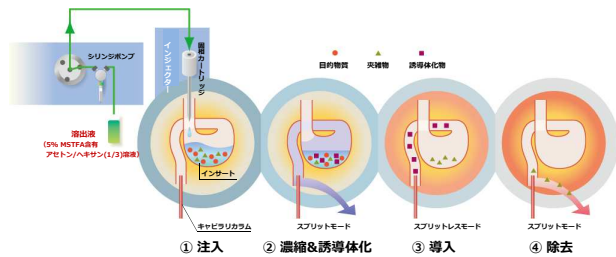


図3 GC注入口における濃縮および誘導体化導入の流れ

表1 LC-GC/MS条件

HPLC (MIDAS;Spark, Agilent 1100)	
Injection:	100 μL, Sample loop
Column:	3.0 mm i.d. × 100 mm Inertsil ODS-3
Solvents:	A: water B: Acetonitrile
flow rate:	0.5 mL/min
Gradient(B%) :	0min(40%)-9min(40%)-12min(90%)-14min(90%)
Detector:	UV 210 nm
Interface LC-GC (LGI-S110; AiSTI)	
SPE:	2 mm i.d. × 10 mm C18
Diluting:	water 0.5 mL/min
Purge:	N ₂ gas, 3 min
Elution:	acetone/Hexane(1/3), 50 μL
Interface Injector (LVI-S200; AiSTI)	
Insert:	Spiral Insert
Solvent Vent:	0.60min, Purge flow 150 mL/min
Splitless:	4 min
Inj. Temp.:	70°C(0.6min)-120°C/min-290°C(15min)
GC/MS (6890N/5975C; Agilent)	
Column:	0.25 mm i.d. × 30 m, df 0.25μm BPX-5
Oven:	60°C(4min)-20°C/min-300°C(3min)
Carr. gas:	He, 1 mL/min
MS:	SIM

3 結果と考察

3.1 誘導体化について

オンラインLC-GC/MS誘導体化分析法による17β-エストラジオールのTMS誘導体化率は81% (n=5)であった。また、非TMS誘導体化の17β-エストラジオールは検出されなかった。再現性は相対標準偏差 (RSD, n=5) が2%以内と良好な結果が得られた(表2)。

LCにおいて17β-エストラジオールの近くに溶出するテストステロンを添加した混合標準液を測定した結果、両化合物の分離および検出が可能であった(図4, 図5)。

表2 17β-エストラジオールのTMS誘導体化試験結果

	GC/MS (pg)		LC-GC/MS (pg)						RSD(%)	REC(%)
	ST-1	ST-2	1	2	3	4	5	Ave.		
17β-Estradiol-TMS	1000	500	803	815	793	800	817	806	1.26	80.6
Testosterone-TMS	1000	500	815	827	820	816	821	820	0.58	82.0

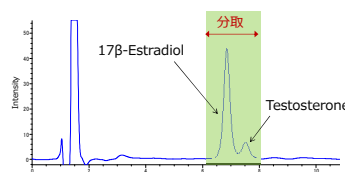


図4 HPLC-UV(210 nm) クロマトグラム

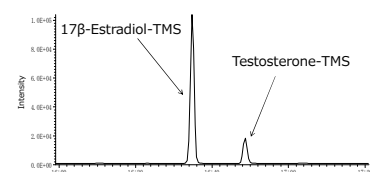


図5 HPLC-GC/MS トータルイオンクロマトグラム

従来のTMS誘導体化は30分以上の時間を要するが本法では36秒と大幅に時間を短縮できた。誘導体化が効率良く行われた理由として、誘導体化試薬を含有させた溶液で固相カートリッジから目的成分を溶出させながら直接GCへ注入した後、インサート中での濃縮工程において溶媒分子が少なくなることで、17β-エストラジオール分子と誘導体化試薬分子の衝突率が高まり、さらに注入口の熱が加わることで反応が促進されたことが考えられた。

3.2 感度について

本法ではHPLCに注入した目的物質を固相カートリッジに保持させ、その全量をGC/MSに導入できる。HPLCの注入量を100μLに増加させることにより本システムの検出感度は向上し、50pg/mLの17β-エストラジオールおよびテストステロンを検出できた(図6)。

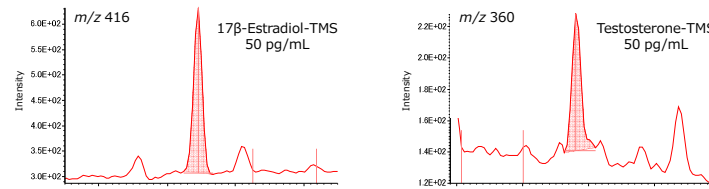


図6 HPLC-GC/MS マスクロマトグラム

3.3 前処理の簡易化・迅速化について

水試料を固相抽出し、本法により分析した(図7)。

3.2で示したように本システムは高感度であるため、試料量を従来法の1Lから100mLに減らすことができた。

さらに、最終検液に水分が含まれた状態でも分析可能であるため、固相の乾燥工程を省くことができた。これらにより、本法は従来法と比較して前処理時間を大幅に短縮することができた。

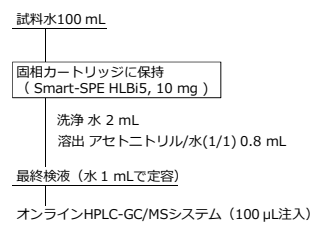


図7 水試料前処理フロー

3.4 精製水における添加回収試験および河川水の分析

17β-エストラジオール濃度が1ng/Lとなるように調製した精製水100mLを用いて添加回収試験を行った (n=5)。検量線はHPLC-GC/MSで作成し、回収率が101%、再現性がRSD=5.1%と良好な結果が得られた(表3)。

表3 精製水における添加回収試験

	Recovery (%)					RSD(%)
	1	2	3	4	5	
17β-Estradiol	98	104	97	98	109	101

和歌山市で採取した河川水100mLを前処理し分析した(図8)。その結果、17β-エストラジオール濃度は0.39ng/L (n=4)、河川水における添加回収率は99%であった (1ng/L, n=2)。

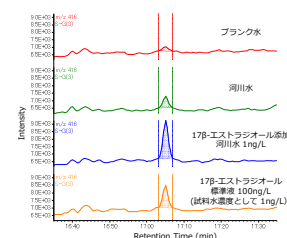


図8 河川水分析のマスクロマトグラム

4 まとめ

オンラインLC-GC誘導体化分析法により、再現性の良い17β-エストラジオールの自動誘導体化分析が可能となった。また、本法は前処理の簡易化および迅速化、さらには高感度分析が実現できた。精製水における添加回収および再現性の試験結果は良好であり、河川水の分析も可能であった。今後、夾雑物の多い試料中の誘導体化を行う分析への応用が期待できる。